Pittieria, Volumen 2 N° 31 (2001-2002). pp. 57-69

Actividad reductora de acetileno de bacterias asociadas a las Glumifloras del páramo Loma Redonda, Mérida-Venezuela

Acetylene reducing activity of Glumiflorae related bacteria at the Loma Redonda Páramo, Mérida-Venezuela

María Eugenia Marquina, Roberto Mario Skwierinski y Benito Briceño

Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Fijación Biológica del Nitrógeno. Núcleo la Hechicera, Edif. A, Mérida, Venezuela. martu@ula.ve[1], skwierin@ula.ve [2], bricenob@ula.ve

Resumen

El estudio florístico de las glumifloras efectuado en la Estación Loma Redonda del Teleférico de Mérida, mostró el predominio de ***Agrostis, Calamagrostis, Poa*** (Poaceae) y ***Carex*** (Cyperaceae). El ensayo de reducción de acetileno evidenció que 21 especies (87,5 %) de un total de 24 especies de glumifloras recolectadas, establecen simbiosis asociativas con bacterias diazotróficas microaerofílicas. Los suelos hidromórficos y las épocas lluviosas favorece el incremento del número de especies vegetales, el porcentaje de raíces asociadas con bacterias fijadoras de nitrógeno y la tasa de la actividad reductora de acetileno (ARA) de los segmentos radicales, comparados con los suelos relativamente secos o la época de sequía. La población rizosférica manifiesta actividad nitrogenasa predominantemente en cultivos libres de nitrógeno que contienen ácido málico-glucosa; sin embargo, las asociaciones de ***Agrostis trichodes, Poa annua*** y ***Poa sp.*** también pueden utilizar como fuentes carbonadas exclusivas, ácidos orgánicos. El 71,4 % de las especies glumifloras estudiadas muestran la mayor parte de la población diazotrófica ubicada sobre la superficie radical y en la endorrizosfera, el 21,4% sólo en la parte superficial y el 7, 14 %, no mostró actividad nitrogenasa en ninguna localidad.

Palabras clave: ARA, diazotrofos rizosféricos, glumiflora, páramo.

Abstract

According to the floristic estudy of glumiflorae carried out at the Loma Redonda Station of Mérida's Cablecar, there is a predominance of ***Agrostis, Calamagrostis, Poa*** (Poaceae) and ***Carex*** (Cyperaceae). Acetylene reduction provides evidence of an associated symbiosis with microaerofilic diazotrophic bacteria in 21 species (87,5%) out of 24 glumiflorae species collected. The number of plant species, the average number of roots associated with nitrogen fixing bacteria and the reducing activity of acetylene (ARA) in radical segments is higher both in hydromorphic soils and during the rainy season, in comparison to those plants growing in dried soils or during the dry season. The rhizospheric population shows nitrogenase activity mainly in nitrogen-free cultures, with malic-glucose acid. However, associations of ***Agrostis trichodes, Poa annua***, and ***Poa sp.***, can also use organics acids as a carbonate source exclusive. In 71,4% of the species assayed the most of diazotrophic populations are found over the radical surface and in the endorhizosphere; while in 21,4% only it is found in the superficial area and in the 7,14% of the species, the rhizospheric population did not sow nitrogenase activity at any locality.

Key words: ARA; rhizospheric diazotrophic; glumiflorae; paramo.

Introducción

La fijación de nitrógeno en bacterias de vida libre asociadas a raíces y bajo la influencia directa del huésped, se denomina "fijación de nitrógeno asociativa" (Klucas, 1991; Elmerich *et al.*, 1992), y pueden representar una fuente directa y significativa de nitrógeno en los ecosistemas de las regiones tropicales (Neyra y Döbereiner, 1977). La localización de estos organismos pueden variar en relación a la especie bacterial, la especie de planta y estado de desarrolllo de ésta (Neyra y Döbereiner, 1977, Magalhaes *et al.*, 1977). La mayor actividad nitrogenasa, de estos organismos, está asociada con el suelo rizosférico o con el interior de la raíz (Döbereiner *et al.*, 1976; Patriquin y Döbereiner, 1978; Boyle y Patriquin, 1980), presentando una variación estacional que en algunos casos coincide con la etapa reproductiva de la planta y también se ha evidenciado un incremento con el crecimiento de las hojas y la declinación con la senescencia de las mismas (Tjepkema y Burris, 1976; Lee *et al.*, 1977). Los diazotrófos, capaces de asociarse a las raíces, ocupan hábitats acuáticos y terrestres (Barraquio *et al.*, 1982; Eckardt y Biesboier 1987; Kanungo *et al.*, 1997; Donnelly y Herbert, 1999; Steppe y Paerl, 2002) y están desde el ártico hasta el trópico (Nosko *et al.*, 1994; Van Berkum y Bohlool, 1980). El régimen hídrico y humedad de los suelos afecta la composición, tamaño de la población de microorganismos de vida libre y diazotróficos, siendo la incidencia en suelos secos mucho menor que en suelos húmedos (Barraquio *et al.*, 1982; Rao y Rao, 1984). De igual manera la mayor actividad nitrogenasa se ha resgistrado asociadas a plantas que crecen en sitios húmedos e inundados en comparación con los suelos secos (Vlassak *et al.*, 1973; Tjepkema y Burris, 1976; Eckardt y Biesboer, 1987).

Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae y ***Erwinia herbicola*** (Enterobacte-riaceae) son bacterias asociativas en sorgo y trigo en una región de la zona templada (Pedersen *et al.*, 1978). Además se ha demostrado que algunos géneros bacterianos ***Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas*** y ***Azospirillum lipoferum*** fijan nitrógeno atmosférico en 13 especies de Poacea, proceso que fue independiente de la acidez del suelo debido a que se ubican dentro del tejido radical (Haahtela *et al.*, 1981). ***Azospirillum*** es más frecuente e importante en zonas cálidas que templada, pero existen cepas que soportan bajas temperaturas (Van Berkum y Bohlool, 1980). Esta bacteria, además de asociarse con gramíneas, también lo hace con ***Carex pallescens*** (Haahtela *et al.*, 1981) y ***Alchemilla pinnata*** (Rosaceae) que crece por arriba de 1.800 msnm (Pernasetti *et al.*, 1998).

Los diazotrofos ***Azotobacter paspali*** y ***Azospirillum brasilense*** utilizan como únicas fuentes carbonadas, glucosa y sacarosa, para el crecimiento y fijación de nitrógeno a diferencia de ***Azospirillum brasilense*** que prefiere los ácido ácidos orgánicos, lactato, malato y citrato (Döbereiner y Day, 1976; Tarrand *et al.*, 1978). De igual manera algunas bacterias anaeróbicas facultativas pueden emplear la sacarosa, la fructosa, el manitol además de los ácidos málico y fumárico, sin embargo, varios géneros aeróbicos no utilizan los disacáridos como fuentes energéticas, pero si el malato y la glucosa (Haahtela *et al.*, 1983).

Los ensayos de ARA y anticuerpos marcados con fluoresceína han mostrado la presencia de ***Azospirillum*** en ***Panicum sp.*** y ***Zea mays*** L. de Venezuela (Tyler et al., 1979). Por otra parte, Skwierinski (comunicación personal) logró aislar de las raíces de ***Muhelenbergia ligularis***, que crece a 3.550 msnm, una bacteria mótil muy similar a este género y la cual es responsable de la actividad nitrogenasa que se manifiesta *in situ*.

La alta diversidad de las glumifloras en los páramos (Ricardi *et al.*, 1987; Briceño y De Robert 1996), el ambiente de bajas temperaturas, heladas frecuentes, suelos con pH 4,5-6,0 (Fariñas y Monasterios, 1980) y el crecimiento de algunas de estas plantas sobre los afloramientos rocosos en sustrato poco meteorizado y escazo espesor, producido sólo por la acumulación de materia orgánica en lenta descomposición, condujeron a realizar un inventario de las Poaceae y Cyperaceae para evidenciar la presencia de diazotrofos rizosféricos, establecer la localización en la raíz y evidenciar los efectos de algunas fuentes carbonadas en la actividad nitrogenasa.

Materiales y métodos

Descripción del área de estudio

El área bajo estudio está ubicada en el Occidente de Venezuela, en el Este del Estado Mérida, forma parte del núcleo central de los Andes venezolanos, específicamente de la vertiente Norte del Parque Nacional Sierra Nevada, en un sector adyacente a la Estación Loma Redonda del Sistema Teleférico. Esta área se localiza entre los 8° 32' 25" y 8° 32' 55" Lat. N y 71° 04' 16" y 71° 04' 42" Long. O (Figura 1), a una altura comprendida entre 3.953-4.050 msnm. El paisaje está dominado por morrenas, picachos, aristas y valles glaciales (Shubert, 1980), con cíclos fre-

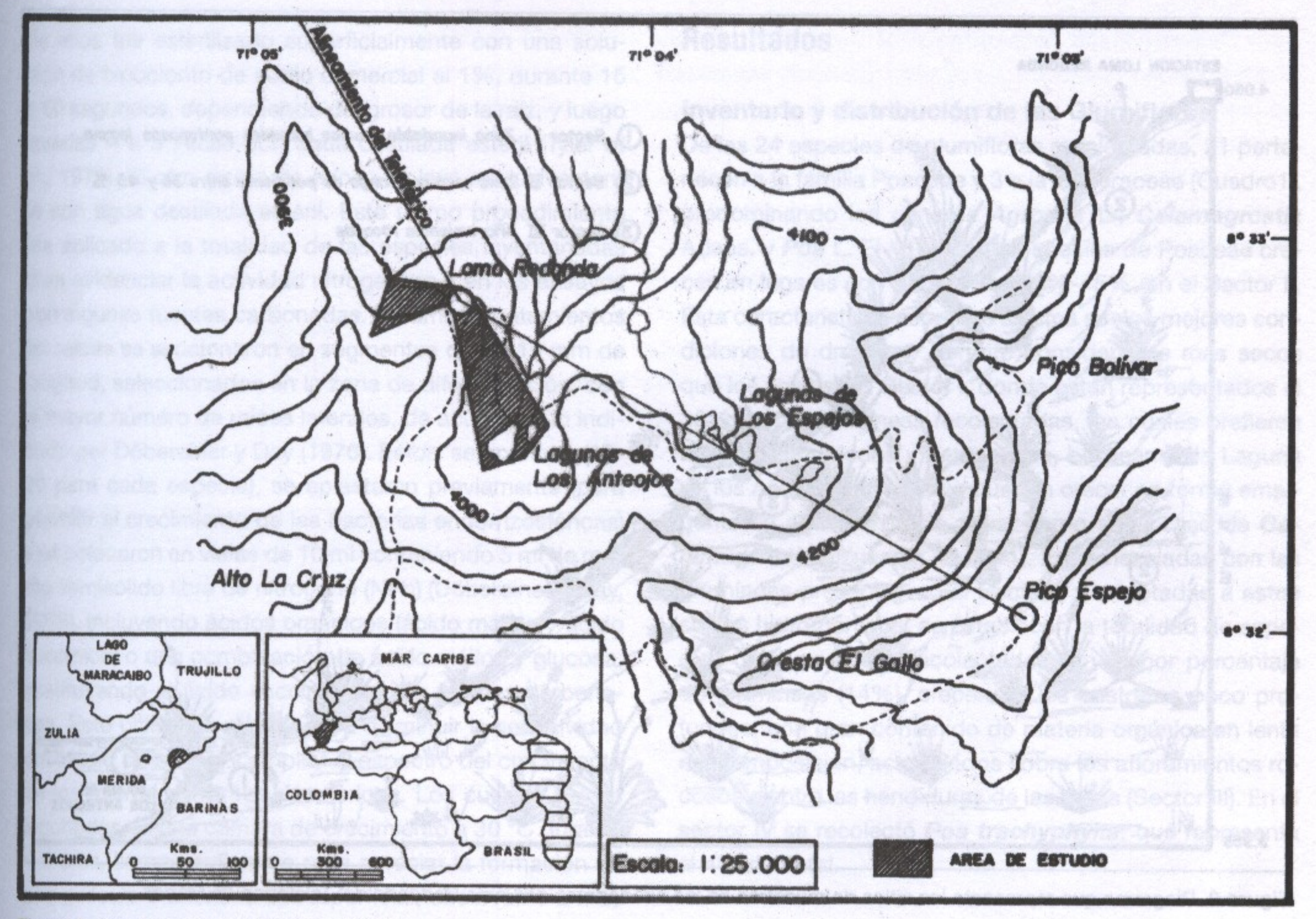


Figura 1. Localización del área de estudio

cuentes, hasta diarios de congelamiento y descongelamiento, concentrados en los meses más secos. La temperatura promedio anual es de 4 °C (Monasterios y Reyes, 1980).

La vegetación dominante está constituida por pajonales y rosetales bajos, encontrándose además algunos enclaves de bosques de ***Polylepys sericea*** Wedd., cercanos a la Estación del Teleférico.

Sitios de muestreo

Se eligieron cuatro sectores, distinguibles por las siguientes características:

Sector I: Se refiere a las zonas inundables durante la época de lluvia, con suelos húmedos a pantanosos durante la época de menor pluviosidad y comprende los alrededores de la Laguna de los Anteojos (semivalle fluvio-glacial), incluso pequeños islotes con gramíneas que crecen emergentes en la laguna.

Sector II: Son consideradas aquellas zonas con pendientes marcadas entre 35% y 45%.

Sector III: Incluye los afloramientos rocosos, ubicados de manera dispersa en el área de estudio. En los tres sectores antes mencionados predominan los pajonales, los rosetales bajos y algunos pastizales (Figura 2).

Sector IV: Bosque de ***Polylepis*** Ruiz y Pav., cuya vegetación está controlada por los factores edáficos y fisiográficos más que por el macroambiente. Posee un estrato arboreo entre 3-7 m de altura, uno arbustivo y uno herbáceo (Monasterios, 1980). No se representó en la Figura 2.

Inventario y distribución de las Glumifloras

Las especies fueron recolectadas en la etapa reproductiva, para facilitar el reconocimiento visual y bajo la suposición de coincidir con la época en que pueda registrarse las máximas tasas de actividad nitrogenasa (Lee *et al.*, 1977). La mayoría de los muestreos se efectuaron durante

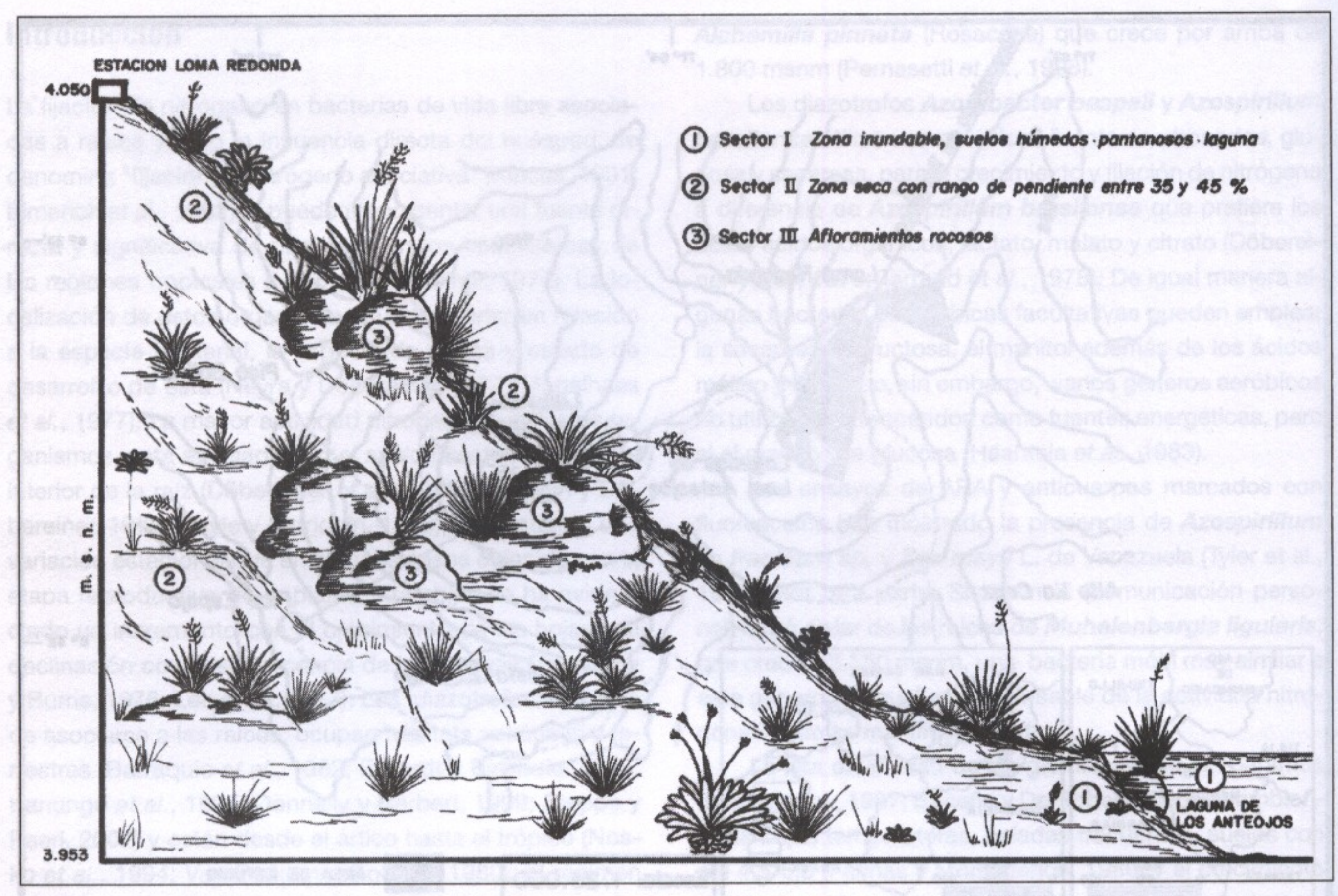


Figura 2. Diagrama que representa los sitios de muestreo en los alrededores de Loma Redonda del Teleférico de Mérida

la estación lluviosa principalmente y algunas especies se recolectaron en la época seca, particularmente en aquellos sitios que mantenían los suelos húmedos y pantanosos.

Se eligieron dos ejemplares de cada especie. Uno de ellos, fue utilizado para la determinación sistemática, basada en la morfología externa comparada y el otro para evidenciar la presencia de organismos fijadores de nitrógeno, mediante el ensayo de la actividad reductora de acetileno (ARA). Se recolectó en cada sector las plantas enteras con una porción de suelo, se colocaron en bolsas plásticas transparentes, e inmediatamente fueron trasladadas al laboratorio, para proceder a la siembra de sus raíces en un medio libre de nitrógeno. En caso de no ser posible, se almacenaban en una nevera a 6 °C, con iluminación artificial, para utilizarlas posteriormente.

Análisis de suelos

Se tomó una muestra compuesta de los primeros 10-20 cm de la superficie del suelo, en forma de zig-zag, tanto del sector I y II. En el sector III se recolectaron 3 muestras de sustratos, depositados sobre los afloramientos rocosos, donde crecía una vegetación similar y luego se mezclaron. Todas las muestras fueron secadas al aire y tamizadas, siendo analizadas por el Laboratorio de Suelos de la Escuela de Geografía de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales de la Universidad de Los Andes.

Evidencia de la presencia de organismos fijadores de nitrógeno

Para estudiar la población rizosferica fijadora de nitrógeno y su localización en la raíz, se efectuaron varios lavados del sistema radical de la planta intacta, en un recipiente con agua corriente, hasta eliminarle la mayor cantidad de partículas del suelo. Luego se separaron las macollas y cortaron los vástagos a una distancia de 2-3 cm por encima del cuello de la zona radical, para una mejor manipulación y continuar los lavados con agua destilada estéril (3-5 lavados). Se cortaron las raíces cerca del punto de donde emergen y se separaron en dos grupos, uno

de ellos fue esterilizado superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 1%, durante 15 a 60 segundos, dependiendo del grosor de la raíz, y luego lavadas 4 a 5 veces con agua destilada estéril (Tyler *et al.*, 1979). El otro grupo de raíces se lavó exclusivamente con agua destilada estéril. Este último procedimiento fue aplicado a la totalidad de las especies inventariadas para evidenciar la actividad nitrogenasa y en los ensayos con algunas fuentes carbonadas. En ambos tratamientos las raíces se seccionaron en segmentos de 10-15 mm de longitud, seleccionados en la zona de diferenciación, con el mayor número de raíces laterales, de acuerdo a lo indicado por Döbereiner y Day (1976). Estos segmentos, (10-20 para cada especie), se aplastaron previamente (para permitir el crecimiento de las bacterias endorrizosféricas) y se colocaron en viales de 10 ml conteniendo 5 ml de medio semisólido libre de nitrógeno (NFb) (Döbereiner y Day, 1976), incluyendo ácidos orgánicos (ácido málico y ácido succínico) o una combinación de ácido málico y glucosa, sustituyendo al ácido succínico, como fuentes carbonadas. Esto último se realizó, para disminuir la selectividad del medio de cultivo y ampliar el espectro del crecimiento de los microorganismos rizosféricos. Los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento a 30 °C durante 5-8 días, tiempo suficiente para apreciar la formación de una película bacteriana subsuperficial, observable a más o menos 2-5 mm de profundidad y realizar el dosaje de la actividad nitrogenasa, mediante el ensayo de la actividad reductora de acetileno (ARA).

Ensayo de la reducción de acetileno

La capacidad fijadora de nitrógeno de las bacterias diazotróficas asociadas a las raíces de las Poaceae y Cyperaceae fue determinada mediante el ensayo de la reducción de acetileno-etileno, siguiendo una metodología similar a la señalada por Burrys (1974). Para ello, se inyectó acetileno puro en el volumen libre del vial hasta obtener una concentración del 10%, posteriormente se incubaron los viales a 30 °C durante 2, 4 ó 6 horas, al cabo de las cuales, se tomaron muestras de 0,25 ml de la fase gaseosa, para efectuar los dosajes en el cromatógrafo de gases Perkin Elmer, modelo Sigma 3, dotado de un detector de ionización de llamas a 120 °C, columna Poropack R, temperatura del horno (85 °C, 65 °C y 45 °C), temperatura del inyector 120 °C.

Se determinaron los pesos secos de los segmentos radicales que fueron dosados, después de colocarlos en una estufa a 100 °C por 48 horas.

Resultados

Inventario y distribución de las Glumifloras

De las 24 especies de glumifloras recolectadas, 21 pertenecen a la familia Poaceae y 3 a la Cyperaceae (Cuadro1), predominando los géneros ***Agrostis*** L., ***Calamagrostis*** Adans. y ***Poa*** L. El 46% de las especies de Poaceae crecen en lugares con pendientes 35%-45%, en el Sector II. Esta característica le confiere a estos suelos mejores condiciones de drenaje y permite considerarlos más secos que los suelos del Sector I, donde están representados el 36% de las gramíneas recolectadas, las cuales prefieren los suelos húmedos y pantanosos, bordeando la Laguna de los Anteojos e inclusive pueden crecer en forma emergente en ese cuerpo de agua, como es el caso de ***Calamagrostis effussa*** (Cuadro 1). Entremezcladas con las gramíneas presentes en el Sector I y adaptadas a estos suelos hidromórficos, se establecen la totalidad de especies de Cyperaceae recolectadas. Un menor porcentaje de gramíneas (14%), crecen en los sustratos poco profundos, con gran contenido de materia orgánica en lenta descomposición, acumulados sobre los afloramientos rocosos o entre las hendiduras de las rocas (Sector III). En el sector IV se recolectó ***Poa trachyphylla***, que representa el 4% del total.

Suelos

Los análisis revelaron que estos suelos son pobres en cationes como magnesio, sodio y calcio, el potasio está en niveles altos. El contenido de materia orgánica es abundante, y puede explicar el elevado porcentaje de nitrógeno total de las muestras analizadas. Los suelos o sustratos de los tres sectores analizados poseen un pH 4,2-5,2, incrementándose el grado de acidez en los afloramientos rocosos. La textura de todos los sectores muestreados es franco arenosa, por lo tanto el mayor o menor drenaje, viene dado en gran parte por la estructura y la pendiente del terreno, como se puede observar en el perfil longitudinal (Figura 2).

Evidencia de la presencia de organismos fijadores de nitrógeno

El cuadro 1 muestra las especies de cada sector con presencia o ausencia de actividad reductora de acetileno. ***Calamagrostis heterophylla*** del Sector I y ***Aciachne acicularis*** del Sector II resultaron positivas al subcultivarlas en medios frescos con el fin de enriquecer la población bacteriana y obtener actividad reductora de acetileno,

pero ***Calamagrostis heterophylla*** del Sector II no tiene dicha actividad reductora. Es posible que otras especies no probadas de esta manera, también resulten positivas después de varios subcultivos.

La totalidad de las especies de Poaceae y Cyperaceae recolectadas en el Sector I, tenían ARA, a diferencia de las plantas que crecen en las zonas más secas con pendientes pronunciadas (Sector II), donde se determinó el 69,2% de especies con ARA. En el Sector III, el 60% de los ejemplares recolectados sobre los afloramientos rocosos presentaron ARA, siendo también evidente en la especie que crece en el bosque de ***Polylepis*** del Sector IV.

La microflora rizosférica fijadora de nitrógeno en su mayoría mostró actividad reductora de acetileno en cultivos semisólidos libres de nitrógeno, con ácido málico y glucosa (Cuadro 2), a diferencia de ***Agrostis trichodes,***

Cuadro 1. Inventario de plantas glumifloras asociadas a bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en el Páramo Loma Redonda.

Sitios de recolección	Especies recolectadas	Actividad reductora de acetileno (ARA)
Sector I Zonas inundables suelos húmedos - pantanosos y laguna	FAMILIA POACEAE	
	Agrostis meridensis Luces	+
	Agrostis tolucensis Kunth *	+
	Calamagrostis chaseae Luces	+
	Calamagrostis effussa (Kunth) Steud.**	+
	Calamagrostis fibrovaginata Laegaard	+
	Calamagrostis ligulata (Kunth) Hitchc.	+
	Calamagrostis heterophylla (Wedd.) Pilg.*	+ (a)
	Muhlenbergia ligularis (Hack.) Hitchc.	+
	Poa annua L.*	+
	FAMILIA CYPERACEAE	
	Carex albolutescens Schwein	+
	Carex bonplandii Kunth	+
	Uncinia hamata (SW.) Urb.	+
Sector II Zonas secas pendientes 35% - 45%	FAMILIA POACEAE	
	Aciachne acicularis Benth	+ (a)
	Agrostis tolucensis Kunth*	+
	Agrostis trichodes (Kunth) Roem. & Shult.	-
	Brachypodium mexicanum (Roem. & Shult.) Link*	+
	Calamagrostis amoena (Pilg.) Pilg.	-
	Calamagrostis heterophylla (Wedd.) Pilg.*	-
	Calamagrostis pisinna Swallen	+
	Calamagrostis pittieri Hack.	+
	Cortaderia hapalotrichia (Pilg.) Cornet*	-
	Poa annua L.*	+
	Poa denticulata Hack	+
	Trisetum irazuense (Kuntze) Hitchc.	+
	Vulpia australis (Nees ex Steud.) C.H. Blom	+
Sector III Afloramientos rocosos	FAMILIA POACEAE	
	Agrostis tolucensis Kunth*	+
	Brachypodium mexicanum (Roem. & Schult.) Link*	+
	Calamagrostis amoena (Pilg.) Pilg *	-
	Cortaderia hapalotrichia (Pilger) Cornet*	-
	Poa sp.	+
Sector IV Bosque Polylepis	FAMILIA POACEAE	
	Poa trachyphylla Pilg.	+

*Especies recolectadas en dos o más sectores. **Planta sumergida en la laguna. (a) ARA después de varios subcultivos.

Cuadro 2. Porcentaje de segmentos radicales de las glumifloras, con actividad reductora de acetileno, cultivados en medios libres de nitrógeno, con ácido málico-glucosa.

Especies recolectadas	Actividad Reductora de Acetileno (ARA)*	
	Muestras ensayadas	Muestras positivas (%)
POACEAE		
Aciachne acicularis Benth.	12	100 (a)
Agrostis meridensis Luces	26	55
Agrostis tolucensis Kunth	18	44
Agrostis trichodes (Kunth) Roem. & Schult.*	11	36
Brachypodium mexicanum (Roem. & Schult.) Link	12	33
Calamagrostis chaseae Luces	37	34
Calamagrostis fibrovaginata Laegaard	11	73
Calamagrostis effusa (Kunth) Steud.	39	46
Calamagrostis ligulata (Kunth) Hithc.	19	79
Calamagrostis heterophylla (Wedd.) Pilg.	12	100 (a)
Cortaderia hapalotrichia (Pilg.) Cornet	25	76
Muhlenbergia ligularis (Hack.) Hitchc.	39	24
Poa annua L. *	16	100
Poa trachyphylla Pilg.	19	84
Poa sp.*	18	61
Trisetum irazuense (Kuntze) Hitchc.	17	24
Vulpia australis (Nees ex Steud.) C.H. Blom	35	75
CYPERACEAE		
Carex albolutescens Schwein	56	36
Carex bonplandii Kunth	56	75
Uncinia hamata (Sw.) Urb.	28	60

* (AR A) en medios libre de nitrógeno con ácido málico-glucosa y ácido málico-succínico. (a) ARA después de varios subcultivos. Condiciones del cromatógrafo de gases: Temperatura del detector de ionización de llamas = 120 °C. Temperatura del inyector = 120 °C. Temperatura del horno = 65°C.

Poa annua y ***Poa sp.***, que resultaron positivas, también en cultivos que contenían únicamente ácido málico y ácido succínico (Cuadro 3). En algunos viales que contenían segmentos radicales no se observó crecimiento de bacterias, o era muy escaso, indicando que la población rizosférica fijadora de nitrógeno no presentaba una distribución uniforme a lo largo de las raíces laterales.

En la Cuadro 4, se señalan los efectos de la esterilización superficial de los segmentos radicales sobre la ARA, notándose que alrededor del 71,4% de las especies ensayadas presentaron la mayor parte de la población bacteriana sobre la superficie radical, la otra porción de la microflora rizosférica que no era accesibles al hipoclorito durante los tiempos ensayados, probablemente se hallen en la endorrizosfera (tejidos corticales) o embebidos en el mucigel (Umali-García *et al.*, 1980). El 21,42 % constituido por las gramíneas, ***Agrostis trichodes, Calamagrostis fibrovaginata*** y ***Poa denticulata***, no mostraron resultados positivos al esterilizar superficialmente los segmentos radicales, sugiriendo una ubicación de las bacterias diazotróficas, predominantemente superficial. El 7,14% representado por la especie ***Calamagrostis pittieri*** no

Cuadro 2. Porcentaje de segmentos radicales de las glumifloras, con actividad reductora de acetileno, cultivados en medios libres de nitrógeno, con ácido málico-glucosa.

Especies recolectadas	Actividad Reductora de Acetileno (ARA)*	
	Muestras ensayadas	Muestras positivas (%)
POACEAE		
Aciachne acicularis Benth.	12	100 (a)
Agrostis meridensis Luces	26	55
Agrostis tolucensis Kunth	18	44
Agrostis trichodes (Kunth) Roem. & Schult.*	11	36
Brachypodium mexicanum (Roem. & Schult.) Link	12	33
Calamagrostis chaseae Luces	37	34
Calamagrostis fibrovaginata Laegaard	11	73
Calamagrostis effusa (Kunth) Steud.	39	46
Calamagrostis ligulata (Kunth) Hithc.	19	79
Calamagrostis heterophylla (Wedd.) Pilg.	12	100 (a)
Cortaderia hapalotrichia (Pilg.) Cornet	25	76
Muhlenbergia ligularis (Hack.) Hitchc.	39	24
Poa annua L. *	16	100
Poa trachyphylla Pilg.	19	84
Poa sp.*	18	61
Trisetum irazuense (Kuntze) Hitchc.	17	24
Vulpia australis (Nees ex Steud.) C.H. Blom	35	75
CYPERACEAE		
Carex albolutescens Schwein	56	36
Carex bonplandii Kunth	56	75
Uncinia hamata (Sw.) Urb.	28	60

* (AR A) en medios libre de nitrógeno con ácido málico-glucosa y ácido málico-succínico. (a) ARA después de varios subcultivos. Condiciones del cromatógrafo de gases: Temperatura del detector de ionización de llamas = 120 °C. Temperatura del inyector = 120 °C. Temperatura del horno = 65°C.

Poa annua y ***Poa sp.***, que resultaron positivas, también en cultivos que contenían únicamente ácido málico y ácido succínico (Cuadro 3). En algunos viales que contenían segmentos radicales no se observó crecimiento de bacterias, o era muy escaso, indicando que la población rizosférica fijadora de nitrógeno no presentaba una distribución uniforme a lo largo de las raíces laterales.

En la Cuadro 4, se señalan los efectos de la esterilización superficial de los segmentos radicales sobre la ARA, notándose que alrededor del 71,4% de las especies ensayadas presentaron la mayor parte de la población bacteriana sobre la superficie radical, la otra porción de la microflora rizosférica que no era accesibles al hipoclorito durante los tiempos ensayados, probablemente se hallen en la endorrizosfera (tejidos corticales) o embebidos en el mucigel (Umali-García *et al.*, 1980). El 21,42 % constituido por las gramíneas, ***Agrostis trichodes, Calamagrostis fibrovaginata*** y ***Poa denticulata***, no mostraron resultados positivos al esterilizar superficialmente los segmentos radicales, sugiriendo una ubicación de las bacterias diazotróficas, predominantemente superficial. El 7,14% representado por la especie ***Calamagrostis pittieri*** no

Cuadro 3. Porcentaje de segmentos radicales de las glumifloras, con actividad reductora acetileno, cultivados en medios libres de nitrógeno conteniendo ácido málico-succínico.

Especies recolectadas	Actividad reductora acetileno (ARA)*	
	Nº muestras ensayadas	Muestras positivas (%)
POACEAE		
Aciachne acicularis Benth	15	0
Agrostis trichodes (Kunth) Roem. & Schult.	19	12
Agrostis tolucensis Kunth	19	0
Calamagrostis amoena (Pilg.) Pilg.	20	0
Calamagrostis pisinna Swalen	35	0
Poa anua L.	19	47
Poa sp.	9	11

* Condiciones del cromatógrafo de gases: temperatura del detector de ionización de llamas 120°C. Temperatura del inyector 120°C. Temperatura del horno 65°C.

Cuadro 4. Efecto de la esterilización superficial de los segmentos radicales sobre la actividad reductora de acetileno

Especies recolectadas	Cantidad muestras analizadas		Muestras con Actividad Reductora de Acetileno				Actividad Reductora Acetileno (nm etileno/hora)	
	Raíces lavadas	Raíces esterilizadas	Raíces lavadas		Raíces esterilizadas		Raíces lavadas	Raíces esterilizadas
			N°	(%)	N°	(%)		
POACEAE								
Agrostis trichodes	10	3	6	60	0	0	12.7 ± 2	0
Agrostis tolucensis	8	8	6	75	2	25	2,0 ± 1,5	0,26 ± 0,0
Calamagrostis effusa	12	8	10	83	5	63	7,4 ± 0,9	1,69 ± 0,46
Calamagrostis pittieri	12	3	0	0	0	0	0	0
Calamag. fibrovaginata	11	3	8	73	0	0	6,8 ± 1,4	0
Cortaderia hapalotrichia	18	7	14	78	5	71	26,2 ± 4,35	1,82 ± 0,3
Muhlenbergia ligularis	10	5	7	70	3	60	4,0 ± 1,9	1,6 ± 1,1
Poa annua	10	6	12	80	4	67	8,2 ± 3	4,0 ± 0,9
Poa sp.	11	7	7	64	4	57	1,4 ± 0,37	0,2 ± 0,1
Poa denticulada	9	3	1	33	0	0	0,1 8± 0,0	0
Trisetum irazuense	8	6	3	63	3	50	4,0 ± 1,85	0,13 ± 0,0
Vulpia australis	10	5	7	70	3	60	2,5 ± 1,1	2,0 ± 0,45
CYPERACEAE								
Carex albolutescens	7	5	6	86	4	80	9,2 ± 4	4,7 ± 2
Uncinia hamata	8	4	6	75	3	75	8,9± 0,2	5,5 ± 0,1

De 14 especies ensayadas, el 71,4 % de las especies presentan actividad nitrogenasa, tanto en el rizoplano como en la endorrizosfera, el 21,42 %, no mostraron resultados positivos después de esterilizar superficialmente y el 7,14 %, no posee actividad nitrogenasa en ninguno de los tratamientos.

Condiciones del cromatógrafo de gases iguales a la citadas en la metodología, eligiendo la temperatura del horno 45°C.

de especies vegetales y el porcentaje de raíces, asociadas con rizobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. En estas condiciones se registraron mayores tasas de actividad reductora de acetileno en los segmentos radicales cultivados en medios libres de nitrógeno, comparados con los provenientes de plantas que crecen en los suelos más secos (pendientes marcadas) o recolectadas durante la época de relativa sequía. Estos efectos de la humedad, inundación y sequía sobre el ARA también han sido demostrado en suelo rizosférico donde crecía arroz o en plantas sumergidas, en donde la actividad nitrogenasa estimada aumenta siguiendo el cambio de una condición no inudable a inundado y decrecía a medida que el suelo inundado retornaba mediante el drenaje a una condición no inundado (Barraquio *et al.*, 1982; Rao y Rao, 1984; Eckardt y Biesboer, 1987). Esto sugiere que el estado hídrico de los suelos, pueden controlar de alguna manera, el mayor o menor número de bacterias que establecen asociación simbiotica y alterar la composición de la microflora de ésta (Barraquio *et al.*, 1982; Rao y Rao, 1984).

Sin embargo, los cultivos de raíces de las plantas de ***C. hapalotrichia*** y ***A. tolucensis*** que crecen sobre los afloramientos rocosos, mostraron la mayor actividad reductora de acetileno inclusive comparadas con las que crecen en suelos inundados y húmedos (Cuadro 5). En el primer caso, la planta es de gran porte y mantiene una gran cantidad de hojas muertas, "necromasa" (Monasterios 1980), creando un microambiente adecuado para mantener cierta humedad y temperatura, aparte de los exudados radicales que podrían permitir el crecimiento de rizobacterias fijadoras de nitrógeno. En el segundo caso, se refiere a una planta que ocupa diversos hábitats y no tiene las cualidades antes mencionada, por lo tanto las altas tasas de actividad reductora de acetileno se puede relacionar tanto con la humedad como con una propiedad inherente a la planta y al propio ciclo de vida, coincidiendo con el estado de floración, donde los exudados radicales o suministros carbonados de la planta, le permiten mantener una población rizosférica diazotrófica que den cuenta de estos resultados (Weier, 1980).

Otro aspecto que puede explicar las mayores tasas de ARA de las especies que crecen sobre los afloramientos rocosos, en comparación a las registradas durante la época de lluvia y la de aquellos suelos que suelen inundarse y mantener la humedad por tiempo más prolongado, podría estar relacionado con una disminución de la población diazotrófica especialmente bacterias aeróbicas, debido a que la disponibilidad de nutrientes y sustratos carbonados, pueden estar limitados entre otros factores: por la descomposición anaeróbica de la materia orgánica bajo condiciones de inundación, con el subsecuente consumo de los productos de descomposición por los organismos del suelo (Charyulu y Rao, 1980), por el suministro adecuado de carbohidratos por parte de la planta, que serán utilizados como agentes quimioatrayentes o fuentes de carbono y energía (Van Berkum y Bohlool, 1980) y además en gramíneas que crecen en zonas marítimas por el oxígeno proveniente de la fotosíntesis (Welsh, 2000). De esta manera se favorecerán algunas cepas diazotrofas con mayor o menor potencial fijador de nitrógeno, cuya asociación contribuirá al crecimiento de las glumifloras, bien sea, por llevar a cabo este proceso y/o por producir reguladores de crecimiento, las cuales podrían incrementar la biomasa radical, promoviendo una mayor absorción de agua y nutrientes por la planta (Lin *et al.*, 1983), es decir, son rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR).

El análisis de las condiciones edáficas de los tres sectores muestreados mostraron características muy similares en cuanto a la textura del suelo, pH, contenido de materia orgánica y nutrientes, probablemente estos factores no sean determinantes en marcar las diferencias entre los porcentajes de especies vegetales con ARA y las mayores tasas de ARA, asi como los altos porcentajes de raíces asociadas con rizobacterias diazotróficas que se registraron en los suelos inundables o que se mantienen húmedos y/o pantanosos en épocas de menor pluviosidad, comparados con los registrados en las zonas más secas.

Es necesario hacer notar, que las tasas de ARA en los segmentos radicales, cultivados en medios de enriquecimiento libres de nitrógeno combinado, no reflejan la capacidad fijadora de nitrógeno "*in situ*", solo puede representar un estimado de la mayor o menor población de bacterias diazotróficas que tenían los segmentos de raíz de cada especie al momento de ser sembrados en los medios de cultivo (Döbereiner *et al.*, 1976). También puede existir la posibilidad de favorecerse en el medio de enriquecimiento, el crecimiento de algunas cepas bacterianas que sean altamente eficientes para fijar nitrógeno atmosférico bajo las condiciones ensayadas. Estas consideraciones también podrían explicar, en parte, las altas tasas de ARA registradas en ***A. tolucensis*** y ***C. hapalotrichia*** en donde pudieran existir una población rizosférica de bacterias diazotróficas que podrían contribuir con los aportes nitrogenados a la vegetación que alli crece.

Esta es una situación análoga a lo ocurrido en las sabanas pastizal en el Oeste de Africa, donde están ausentes las leguminosas y la fijación de nitrógeno por los microoorganismos asociados a las gramíneas contribuyen con un 17% de los requerimientos nitrogenados (Abbadie *et al.*, 1992). En la zona paramera bajo estudio no hay presencia de leguminosas y en los páramos, en general, es muy baja o ninguna la presencia de leguminosas, y ésto junto con la baja tasa de descomposición de la necromasa sugiere que la contribución de los diazótrofos rizosféricos, podría ser una fuente nitrogenada de significancia considerable en el crecimiento de la vegetación que se desarolla en dicho ecosistema, especialmente sobre los afloramientos rocosos.

El incremento de la actividad reductora de acetileno en los cultivos radicales durante la época de mayor pluviosidad en comparación con las de la época "seca", muestran un patrón estacional de la ARA paralelo al régimen hídrico anual.

La ARA se manifiesta predominantemente en los segmentos radicales cultivados en medios libres de nitrógeno, conteniendo ácido málico-glucosa como fuente carbonada, a diferencia de los ensayos realizados con las raíces de ***A. trichodes, P. annua*** y ***Poa sp***., que también resultaron positivos en los cultivos que poseen sólo ácidos orgánicos. Esto sugiere que el medio sin nitrógeno con ácido málico-glucosa como fuentes carbonadas, resulta adecuado, pero es menos selectivo para evidenciar la presencia de organismos diazótrofos en el sistema radical de las especies estudiadas. Los requerimientos carbonados también han sido señalados para los diazotrofos rizosféricos de las gramíneas de las regiones tropicales y templadas (Okon *et al.*, 1976; Tarrand *et al.*, 1978; Haahtela *et al.*, 1983; Martínez *et. al.*, 1984).

Por otra parte, en los organismos diazotróficos asociados a las raíces de ***Spartina alterniflora*** se encontró que la población microaerofílica que utiliza malato es la responsable de la ARA en la endorrizosfera, y los organismos que utilizan glucosa están involucrados en la ARA del rizoplano y suelo rizosférico de la misma planta (Boyle y Patriquin, 1980), es decir, que los datos de los cuadros 2 y 3 parecieran indicar que el mayor porcentaje de ARA es aportada por organismos del rizoplano y suelo rizosférico de la misma planta.

La esterilización superficial de las raíces reduce o anula totalmente el número de muestras fijadoras, así como la actividad reductora de acetileno (Cuadro 4), indicando que existen especies de gramíneas que establecen una asociación más laxa por tener una ubicación sólo superficial. En el caso de aquellos ensayos donde se registró actividad nitrogenasa en ambos tratamientos (esterilizados y lavados superficialmente), se puede sugerir que los diazótrofos tienden a colonizar zonas superficiales o subsuperficiales del sistema radical, bien sea que se hallen embebidos en el mucigel que recubre la superficie radical o en la región epidérmica o cortical. Conclusiones semejantes fueron sugeridas para raíces de cebada y ***Spartina alterniflor***, (Boyle y Patriquin 1980, Pohlman y Mc. Coll, 1982), pero la localización diferencial de los diazotrofos asociativos puede variar de acuerdo a la especie bacerial y la planta involucrada (Neyra y Döbereiner, 1977). En algunos sistemas, la mayor actividad nitrogenasa está asociada con el suelo alrededor de las raíces (suelo rizosférico), mientras que en otros, está estrechamente asociada con las raíces, bien sea que los fijadores de nitrógeno estén sobre o dentro del tejido radical (Boyle y Patriquin, 1980).

Varios trabajos han demostrado la colonización superficial de raíces de gramíneas por ***Azospirillum*** spp. embebido en el mucigel que recubre la raíz (Umali-Garcia *et al.*, 1980) o en el rizoplano del pasto Kallar (Leptochloa fusca), incluso puede existir una ubicación diferencial de dos poblaciones de diazótrofos, dos especies de ***Azospirillum*** que predominan en el rizoplano y bacilos aeróbicos en el interior de la raíz (Hureck *et al.*, 1987). La localización precisa o diferencial de los fijadores de nitrógeno puede variar con las especies bacterianas, la especie de planta y estado de desarrollo de ésta (Magalhaes *et al.*, 1977; Neyra y Döbereiner, 1977).

La mayor ARA se registró en segmentos radicales lavados con agua destilada, indicando que la población diazotrófica se ubica preferencialmente en la superficie radical (71,4% de las especie ensayadas), sin despreciar el aporte de la endorrizosfera. La esterilización superficial eliminó la actividad en 21,4% de las especies probadas, señalando la presencia de diazótrofos sólo en la parte superficial y el 7,14% no mostró ARA en ninguno de los tratamientos efectuados.

Agradecimiento

Al Instituto Nacional de Parques (INPARQUES-Mérida), por conceder el permiso para realizar el trabajo en la Estación Loma Redonda, Teleférico de Mérida (Parque Nacional Sierra Nevada). Al Consejo de Desarrollo Científico

Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes por financiar este trabajo a través del proyecto C-725-95-03-D.

Referencias bibliográficas

ABBADIE, L., MARIOTTI, A. y MENAUT, J. C. 1992. Independence of Savanna Grasses from Soil Organic Matter for their Nitrogen Supply. *Ecology* 73 (2): 608-613.

BARRAQUIO, W. L., GUZMÁN DE M. R., BARION, M. y WATANABE, I. 1982. Population of Aerobic Heterotrophic Nitrogen Fixing Bacteria Associated with Wetland and Dryland Rice. *Appl. Environ Microbiol.* 43(1): 124-128.

BOYLE, C. D. y PATRIQUIN, D. G.1980. Endorhizal and Exorhizal Acetylene Reducing Activity in a Grass (***Spartina alterniflora*** Loisel.) Diazotrophic Association. *Plant Physiol.* 66: 276-280.

BRICEÑO, B. y DE ROBERT, P. 1996. Diversidad y Utilidad de las Plantas Vasculares de un Páramo Triguero de la Sierra Nevada de Mérida. *Pittieria*. 24: 43-61.

BURRYS, R. H. 1974. Methodology. In: *The Biology of Nitrogen Fixation Quispel* (edit.). North Holland Publishing Comoany, Amsterdan. Cap. 2 pp. 9.

CHARYULU, P. B. B. N. y RAO, R. 1980. Influence of Various Soil Factors on Nitrogen by ***Azospirillum*** spp. *Soil Biol. Biochem.* 12: 343-346.

DÖBEREINER, J. y DAY, J. M. 1976. Asociative Simbiosis in Tropical Grasses.Characterization of Microorganisms and Dinitrogen Fixing Sites. In: *Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation*. (W. E. Newton and C. J. Nyman. edts.). Washington State University Press, Pullman. pp. 518-538.

DÖBEREINER, J., MARRIEL I. E. y NERY, M. 1976. Ecological Distribution of ***Spirillum lipoferum*** Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464 -1476.

DONNELLY, A.P. y HERBERT, R.A. 1999. Bacterial Interaction in the Rhizosphere of Seagrass Communities in Shallow Coastal Lagons. *Journal of Applied Microbiology* 85: 151-160 Suppl. S

ECKARDT, N. A. y BIESBOER, D. D. 1987. Ecological Aspects of Nitrogen Fixation (Acetylene Reduction) Associated with Plants of Minnesota Wetland Community. *Can J. Bot.* 66: 1359-1363.

ELMERICH, C., ZIMER, W. y VIEILLE, C. 1992. Associative Nitrogen-Fixing Bacteria. In: *Biological Nitrogen Fixation* (G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans editors). Chapman and Hall, Inc. Cap. 6. pp. 212-258.

FARIÑAS, M. y MONASTERIOS, M. 1980. La Vegetación del Páramo de Mucubají. Análisis de Ordenamiento y su Interpretación Ecológica. En: *Estudios Ecológicos de los Páramos Andinos*. M. Monasterios (edit). Ediciones de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Cap. 10. pp. 263-307.

HAAHTELA, K. KARI, K. y SUNDMAN, V. 1983. Nitrogenase Activity (Acetylene Reduction) of Root Associated, Cold-Climate ***Azospirillum, Enterobacter, Klebsiella*** and ***Pseudomonas.*** Species During Growth on Various Carbon Sources and at Various Partial Pressures of Oxigen. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(2): 563-570.

HAAHTELA, K., WARTIOVAARA, T., SUNDMAN. y SKUJINS, J. 1981. Root Associated N_2 Fixation (Acetylene Reduction) by ***Enterobacteriaceae*** and ***Azospirillum*** Strains in Cold-Climate Spodosols. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1): 203-206.

HURECK, T., REINHOLD, B., FENDRIK, I. y NIEMAN, E. G. 1987. Root-Zone-Specific Oxigen Tolerance of ***Azospirillum spp.*** and Diazotrophic Rods Closely Associated with Kallar Grass. Appl. Environ. Microbiol 53(1): 163-169.

KANUNGO, P.K., RAMAKRISHNAN, B. y RAO, V. R. 1997. Placement Effects of Organic Sources on Nitrogenase Activity and Nitrogen-Fixing Bacteria in Flooded Rice Soils. *Biology and Fertility of Soils*. 25(2): 103-108.

KLUCAS, R. V. 1991. Associative Nitrogen Fixation in Plants. In: *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation* (Dilworth, M. J and Glenn, A. R.Editors). Elsevier Science Publishers B. V. New York. pp 187-198 .

LEE, K. K., ALIGMAGNO, B. y YOSIDA, T. 1977. Field Tecnique Using the Acetylene Reduction Method to Assay Nitrogenase Activity and its Association with the Rizosphere. *Plant Soil*. 47: 519-526.

LIN, W., OKON, Y. y HARDY, R. W. F. 1983. Enhanced Mineral Uptake by ***Zea mays, Sorghum bicolor*** Roots Inoculated with ***Azospirillum brasilense.*** *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (6): 1775-1779.

MAGALHAES, F. M. M., PATRIQUIN, D. y DÖBEREINR, J. 1977. Infection of Field Grown Maize with ***Azospirillum.*** *Rev. Brasil Biol.* 39: 587-596.

MARTÍNEZ, D. G., DEL GALLO, M., BUPEE, C. y BURRIS, R, H. 1984. Catabolism of Carbohydrates and Organic Acids and Expression of Nitrogenase in ***Azospirilla.*** *J. Bacteriol.* 159: 80-85.

MONASTERIOS, M.1980. Las Formaciones Vegetales de los Páramos de Venezuela. En: *Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos*. M. Monasterios (edit.). Ediciones de

la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Cap. 4. pp. 93.

MONASTERIOS, M. y REYES, S. 1980. Diversidad Ambiental y Variación de la Vegetación en los Páramos de los Andes Venezolanos. En: *Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos*. (M. Monasterios edit.). Ediciones de la Universidad de Los Andes. Cap. 3. pp. 47.

NEYRA, C. A. y DÖBEREINER, J. 1977. Nitrogen Fixation in Grasses. *Adv. Agron.* 29: 1-8.

NOSKO, P., BLISS, L.C. y COOK, F.D. 1994. The Association of Free-Living Nitrogen-Fixing bacteria with the Roots of High Artic Graminoids. *Artic and Alpine Research* 26 (2): 180-186.

OKON, Y., ALBRECHT, S. L. y BURRIS, R.H. 1976. Carbon and Ammonia metabolism of ***Spirillum lipoferum.*** J. Bacteriol, 128: 592-597.

PATRIQUIN, D. G. y DÖBEREINER, J. 1978. Light Microscopy Observation of Tetrazolium Reducing Bacteria in the Endorrizosphere of Maize and other Grasses in Brasil. *Can. J. Microbiol*. 28: 734-742.

PEDERSEN, W. L., CHAKRABARTY, K., KLUCAS, R. V. y VIDAVER, A. K. 1978. Nitrogen Fixation (Acetylene Reduction) Associted with Roots of Winter Wheat and Sorghum in Nebraska. *Appl. Environ. Microbiol*. 33: 626-629.

PERNASETTI, S., STEGMAYER, A., DI BARBARO, G. y BORCHIA Y. 1998. Asociación radical de ***Azospirillum sp.*** en Rosaceas de Altura en la Provincia de Catamarca-República Argentina. Memorias de la XIX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. pp. 127. Maturín, Edo. Monagas, Venezuela.

POHLMAN y Mc. COLL, J. G. 1982. Nitrogen Fixation in The Rizosphere and Rhizoplane of Barley. *Plant and Soil*. 69: 341-352.

RAO, R. V. y RAO, J. L. N. 1984. Nitrogen Fixation (C_2H_2 Reduction) in Soil Samples from Rhizosphere of Rice Grown Under Alternate Flooded and Non Flooded Conditions. *Plant and Soil* 81: 111-118.

RICARDI, M., BRICEÑO, B. y ADAMO, G. 1987. Sinopsis de la Flora Vascular del Páramo de Piedras Blancas, Venezuela. *Ernstia*. 44: 4-14.

SCHUBERT, C. 1980. Aspectos Geológicos de Los Andes Venezolanos. Historia Breve Síntesis. El Cuaternario y Bibliografía. En: *Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos* (M. Monasterios Edit.). Ediciones de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Cap. 2. pp. 29-46.

STEPPE, T.F. y Paerl, H. W. 2002. Potential N_2 Fixation by Sulfate-Reducing Bacteria in a Marine Intertidial Microbial Mat. Aquatic Microbial Ecology. 28 (1): 1-12 .

TARRAND, J. J. KRIEG, N. R. y DÖBEREINER, J. 1978. A Taxonomic Study of the ***Spirillum lipoferum*** Group, with Descriptions of a New Genus ***Azospirillum*** gen. nov. and Two Species. ***Azospirillum lipoferun*** (Beijerinck) com. nov. and ***Azospirillum brasilense*** sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.

TJEPKEMA, J. D. y BURRIS, R. H. 1976. Nitrogenase Activity Associated with Some Winsconsin Prairee Grasses. *Plant Soil.* 45: 81-94.

TYLER, M. E., MILAM, J. R., SMITH, R. L., SHANK, S. C. y ZUBERER, D. A. 1979. Isolation of ***Azospirillum*** from Diverse Geographic Regions. *Can. J. Bot.* 25 (6): 693-697.

UMALI-GARCIA, M., HUBBELL, D. H., GASKIN, D. H y DAZO, F. B. 1980. Association of ***Azospirillum*** with Grass Roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 219-226.

VAN BERKUM, P. y BOHLOOL, B. B. 1980. Evaluation of Nitrogen Fixation by Bacteria in Association with Roots of Tropical Grasses. *Microbiological Reviews.* 44 (3): 491-517.

VLASSAK, K., PAUL, E. A. y HARRIS, R. E. 1973. Assessment of Biological Nitrogen Fixation in Grassland and Associated sites. *Plant Soil* 38: 637-649.

WEIER, K.L.1980. Nitrogen Fixation Associated with Grasses. *Tropical Grasslands*. 14 (3): 194-201.

WELSH, D.T. 2000. Nitrogen Fixation in Seagrass Meadows: Regulation, Plant-Bacteria Interactions and Significance to Primary Productivity. *Ecology Letters* 3 (1): 58-71.